

SISTEMA DE TINCIÓN ÁCIDO PERIÓDICO-SCHIFF (PAS)

(Procedimiento número 395)

APLICACIÓN

Los reactivos de ácido periódico Schiff (PAS) están diseñados para uso diagnóstico *in vitro*.

El procedimiento de tinción PAS de Sigma-Aldrich ofrece métodos estándar y de microondas para la demostración de linfocitos y mucopolisacáridos. El patrón de tinción de los linfocitos es útil para la toma de decisiones terapéuticas en casos establecidos de leucemia linfocítica. La reacción de PAS en los cortes de tejido es útil para la demostración de mucopolisacáridos. El procedimiento de digestión con diastasa (α-amilasa), seguido de la tinción PAS, es útil como ayuda en el diagnóstico de la enfermedad de almacenamiento de glicógeno.

El procedimiento de tinción PAS también puede utilizarse para la demostración de organismos fúngicos en los cortes de tejidos[2].

Cuando se tratan con ácido periódico, los glicoles se oxidan en aldehídos. Tras la reacción con el reactivo Schiff (una mezcla de pararosanilina y metabisulfito sódico), se libera un aducto de pararosanilina que tiñe los componentes celulares que contienen glicol[1]. Esta reacción puede realizarse en frotis de sangre o médula ósea, en improntas de tejidos o en cortes de tejidos[2,3]. Cuando se utiliza con frotis de sangre o médula ósea, esta prueba puede ser útil en el reconocimiento de algunos casos de eritroleucemia y leucemia linfoblástica aguda[4].

La digestión con diastasa (α-amilasa) puede utilizarse como ayuda en el diagnóstico de la enfermedad de almacenamiento de glicógeno. La diastasa hidroliza el almidón, el glicógeno y los productos de degradación que tienen su origen en estos polisacáridos presentes en el tejido. Los productos derivados resultantes del proceso de digestión se desechan mediante lavado antes de la tinción PAS[5].

Los procedimientos de Sigma-Aldrich incluyen técnicas PAS para una tinción rápida en hornos microondas[6-8].

REACTIVOS

SOLUCIÓN DE ÁCIDO PERIÓDICO, número de catálogo 395-1
Ácido periódico, 1 g/dl.

REACTIVO SCHIFF, número de catálogo 395-2
Pararosanilina HCl, 1 %, y metabisulfito sódico, 4%, en ácido clorhídrico, 0,25 mol/l.

SOLUCIÓN DE HEMATOXILINA GILL Nº 3, número de catálogo GHS-3
Hematoxilina certificada, 6 g/l, yodato sódico, 0,6 g/l, sulfato de aluminio, 52,8 g/l, y estabilizante.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD:

Almacenar la solución de ácido periódico y el reactivo Schiff en el frigorífico (2–8 °C). Almacenar la solución de hematoxilina Gill Nº 3 a temperatura ambiente (18–26 °C). Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en las etiquetas. La formación de un precipitado en el reactivo de Schiff, número de catálogo 395-2, no afecta al rendimiento.

DETERIORO:

Desechar la solución de hematoxilina Gill Nº 3, si se vuelve marrón (sobreoxidación por aire) o púrpura (pérdida de acidez), o cuando el tiempo requerido para obtener la tinción adecuada supere en más de 5 minutos el tiempo recomendado en el procedimiento.

PREPARACIÓN:

La solución de ácido periódico, el reactivo Schiff y la solución de hematoxilina Gill Nº 3, se suministran listos para su uso.

La SOLUCIÓN FIJADORA DE FORMOL-ETANOL se prepara mezclando 5 ml de formaldehído con 45 ml de etanol al 95 % (alcohol reactivo). Las preparaciones deben ser del día y deben guardarse bien cerradas.

PRECAUCIONES:

Se deben seguir las precauciones normales ejercidas en el manejo de reactivos de laboratorio. Deshacerse de los desechos observando todas las normativas locales, regionales y nacionales. Consultar la Hoja de datos de seguridad del material para obtener cualquier información actualizada sobre riesgos, peligros o seguridad.

Los portaobjetos de control PAS TISSUE-TROL son tejidos humanos embebidos en parafina con PAS y deben ser considerados como potencialmente infecciosos.

Declaración de riesgos y seguridad (EE.UU.)

La solución de ácido periódico es CORROSIVA. Provoca quemaduras. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Desprenderse inmediatamente de todas las ropas contaminadas. Usar ropa protectora adecuada, guantes y protección para los ojos y el rostro.

El reactivo Schiff es TÓXICO. Perjudicial en caso de ingestión. Provoca quemaduras. Puede causar cáncer. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Usar ropa protectora adecuada, guantes y protección para los ojos y el rostro. En caso de accidente o de malestar, buscar atención médica inmediatamente (mostrar la etiqueta si es posible). Uso restringido a profesionales. Evitar la exposición – solicitar instrucciones especiales antes de su uso.

La solución de hematoxilina Gill Nº 3 es PERJUDICIAL. Muy tóxica por inhalación. Irritante para los ojos, sistema respiratorio y piel. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Llevar ropa protectora adecuada. Órganos a los que afecta: hígado y riñones.

El alcohol reactivo es INFLAMABLE e IRRITANTE. Irritante para los ojos, sistema respiratorio y piel. Mantener el envase bien cerrado. Mantener alejado de las llamas – no fumar. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Llevar ropa protectora adecuada.

El xileno es INFLAMABLE y PERJUDICIAL. Posible riesgo de infertilidad. Puede causar daños al feto. Perjudicial por inhalación y por contacto con la piel. Irritante para el sistema respiratorio y la piel. Riesgo de daño grave para los ojos. Mantener alejado de las llamas – no fumar. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Usar ropa protectora adecuada, guantes y protección para los ojos y el rostro. En caso de accidente o de malestar, buscar atención médica inmediatamente (mostrar la etiqueta si es posible).

Declaración de riesgos y seguridad (U.E.)

La solución de ácido periódico es CORROSIVA. Provoca quemaduras. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Desprenderse inmediatamente de todas las ropas contaminadas. Usar ropa protectora adecuada, guantes y protección para los ojos y el rostro.

El reactivo Schiff es TÓXICO. Provoca quemaduras. Puede causar cáncer. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Usar ropa protectora adecuada, guantes y protección para los ojos y el rostro. En caso de accidente o de malestar, buscar atención médica inmediatamente (mostrar la etiqueta si es posible). Uso restringido a profesionales. Evitar la exposición – solicitar instrucciones especiales antes de su uso.

La solución de hematoxilina Gill Nº 3 es PERJUDICIAL. Muy tóxica por inhalación. Irritante para los ojos, sistema respiratorio y piel. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Llevar ropa protectora adecuada.

El alcohol reactivo es ALTAMENTE INFLAMABLE e IRRITANTE. Altamente inflamable. Irritante para los ojos, sistema respiratorio y piel. Mantener el envase bien cerrado. Mantener alejado de las llamas – no fumar. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua abundante y buscar atención médica. Llevar ropa protectora adecuada.

El xileno es PERJUDICIAL. Inflamable. Perjudicial por inhalación y por contacto con la piel. Irritante para la piel. Evitar el contacto con los ojos.

PROCEDIMIENTO

RECOGIDA DE LA MUESTRA:

Se recomienda que la recogida de la muestra se lleve a cabo de acuerdo con las directrices del documento M29-A2 de la NCCLS. Ningún método de prueba puede garantizar la completa seguridad de que las muestras de sangre o tejido no transmitan infecciones. Por lo tanto, todos los derivados de la sangre o muestras de tejido deben considerarse potencialmente infecciosos.

Se utilizan frotis de sangre total heparinizada o con EDTA, o de médula ósea, recién preparados. Fijar cuanto antes[4].

Para los polisacáridos, puede utilizarse tejido fijado con formol tamponado neutro al 10 %, solución de Zenker o de Bouin[2]. Debe tenerse en cuenta que algunos carbohidratos son hidrosolubles[3]. Para la demostración de glicógeno, se recomienda líquido de Carnoy, líquido de Gendre o formol alcohólico ácido[2]. El tiempo necesario para la extracción de la diastasa puede ser más largo cuando el tejido se fija en ácido pícrico con fijador[2]. Los cortes de tejido deben ser de 5 micras.

MATERIAL ESPECIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO:

Solución de formaldehído, 37 %
Alcohol reactivo
Papel de filtro Whatman Nº 4
Los portaobjetos de control PAS, tales como PAS TISSUE-TROL de Sigma, número de catálogo P8814, deben utilizarse en cada proceso.

SÓLO EN PROCEDIMIENTOS CON MICROONDAS:

Horno microondas ACCUMATE(tm) H2100, números de catálogo A 9084 (110 v) o A 9209 (220 v)
Vaso de Coplin con tapas con respiraderos
Concentrado de Scott sustituto del agua corriente, número de catálogo S5134-6x100ML
α-Amilasa (sólo para el procedimiento de extracción de diastasa)

NOTAS:

Si se utiliza el horno microondas H2100 de Sigma-Aldrich, véanse las instrucciones en el Manual del propietario.

Pueden utilizarse frotis de sangre procedentes de individuos clínicamente sanos para fines de control. Los leucocitos polimorfonucleares mostrarán una tinción citoplásmica de color rojo intenso. Cada vez que se realiza una secuencia de tinción deben incluirse cortes de tejido que se sepa que son PAS-positivos y/o que contienen glicógeno. Sigma-Aldrich ofrece PAS TISSUE-TROL™, número de catálogo P 8814, para este fin.

Los datos obtenidos mediante este procedimiento sólo sirven como ayuda en el diagnóstico y deben ser revisados junto con otras pruebas clínicas o información de diagnóstico.

PROCEDIMIENTO:

I. PREPARACIONES DE SANGRE, MÉDULA ÓSEA O IMPRONTAS DE TEJIDOS

Procedimiento estándar:

1. Fijar los frotis de sangre secados al aire durante **1 minuto** a **temperatura ambiente**, con solución fijadora de formol-etanol.
2. Aclarar los portaobjetos durante **1 minuto** con agua corriente del grifo a chorro suave.

3. Sumergir los portaobjetos en solución de ácido periódico, número de catálogo 395-1, durante **5 minutos** a **temperatura ambiente**.
4. Aclarar los portaobjetos varias veces con agua destilada, cambiando el agua cada vez.
5. Sumergir los portaobjetos en reactivo Schiff, número de catálogo 395-2, durante **15 minutos** a **temperatura ambiente**.
   NOTA: Inmediatamente después del uso, tapar el reactivo Schiff y devolverlo al frigorífico (2–8 °C).
6. Aclarar los portaobjetos durante **5 minutos** con agua corriente del grifo.
7. Contrateñir los portaobjetos con solución de hematoxilina Gill Nº 3, número de catálogo GHS-3, durante **90 segundos**.
8. Aclarar los portaobjetos en agua corriente del grifo durante **15–30 segundos**, secar al aire y examinar en el microscopio con una lente de inmersión en aceite (900x). Los portaobjetos pueden montarse en un medio con base de tolueno o xileno.

Procedimiento con microondas:
1. Fijar los frotis secados al aire a **temperatura ambiente** durante **1 minuto**, con fijador de formol-etanol.
2. Aclarar los portaobjetos durante **1 minuto** con agua corriente del grifo a chorro suave.
3. Colocar los portaobjetos en **40 ml** de solución de ácido periódico, dentro de un vaso de Coplin de plástico.
4. Poner en el horno microondas a **800 vatios** durante **10 segundos**.
5. Aclarar bien varias veces con agua desionizada, cambiando el agua cada vez.
6. Colocar los portaobjetos en **40 ml** de reactivo Schiff, dentro de un vaso de Coplin de plástico.
7. Poner en el horno microondas a **800 vatios** durante **15 segundos**. Mezclar la solución con una pipeta Beral o una varilla aplicadora, y dejarla incubar durante **1 minuto**.
8. Aclarar con agua corriente del grifo, a chorro suave, durante **5 minutos**.
9. Colocar los portaobjetos en **40 ml** de solución de hematoxilina Gill Nº 3, dentro de un vaso de Coplin de plástico.
10. Poner en el horno microondas a **800 vatios** durante **10 segundos**.
11. Aclarar con agua corriente del grifo durante **1–2 minutos**, y luego azular con concentrado de Scott sustituto del agua corriente a **temperatura ambiente**.
12. Aclarar con agua corriente del grifo. Secar al aire.
13. Los portaobjetos pueden montarse en un medio con base de tolueno o xileno.

II. CORTES DE TEJIDOS

Procedimiento estándar:
1. Desparafinar e hidratar los cortes con agua desionizada.
2. Sumergir los portaobjetos en solución de ácido periódico, número de catálogo 395-1, durante **5 minutos** a **temperatura ambiente** (18–26 °C).
3. Aclarar los portaobjetos varias veces con agua destilada, cambiando el agua cada vez.
4. Sumergir los portaobjetos en reactivo Schiff, número de catálogo 395-2, durante **15 minutos** a **temperatura ambiente** (18–26 °C).
5. Lavar los portaobjetos durante **5 minutos** con agua corriente del grifo.
6. Contrateñir los portaobjetos con solución de hematoxilina Gill Nº 3, número de catálogo GHS-3, durante **90 segundos**.
7. Aclarar los portaobjetos con agua corriente del grifo.
8. Deshidratar, aclarar y montar los cortes en un medio con base de tolueno o xileno.

Procedimiento con microondas para digestión con diastasa (α-Amilasa):
1. Utilizar portaobjetos de prueba duplicados. Etiquetar uno para la digestión con diastasa y el otro sólo para la tinción PAS.
   NOTA: Se recomienda utilizar los portaobjetos recubiertos con adhesivo de tejido. No utilizar celoidina con los cortes al realizar la digestión con diastasa[2].
2. Desparafinar e hidratar los portaobjetos con agua desionizada.
3. Preparar la solución de trabajo de diastasa (α-amilasa) disolviendo **0,2 g de α–amilasa**, número de catálogo A 3176, en **40 ml** de agua desionizada. Mezclar bien y colocar en un vaso de Coplin de plástico. Preparar inmediatamente antes de su uso.
4. Poner en el horno microondas a **600 vatios** durante **25 segundos**.
5. Extraer los portaobjetos del vaso de Coplin y aclarar el portaobjetos digerido con agua corriente del grifo durante **5 minutos**.
6. Utilizando ambos portaobjetos, el digerido y el no digerido, siga con el procedimiento del horno microondas para el tejido (paso 2).

Procedimiento con microondas:
1. Desparafinar e hidratar con agua desionizada.
2. Colocar los portaobjetos en **40 ml** de solución de ácido periódico, dentro de un vaso de Coplin de plástico. Tapar el vaso sin apretar la tapa, o utilice tapas con agujeros.
3. Poner en el horno microondas a **800 vatios** durante **10 segundos**.
4. Aclarar bien varias veces con agua desionizada, cambiando el agua cada vez.
5. Colocar los portaobjetos en **40 ml** de reactivo Schiff, dentro de un vaso de Coplin de plástico.
6. Poner en el horno microondas a **800 vatios** durante **15 segundos**. Mezclar la solución con una pipeta Beral o una varilla aplicadora, y dejarla incubar durante **1 minuto**.
7. Aclarar con agua corriente del grifo, a chorro suave, durante **5 minutos**.
8. Colocar los portaobjetos en hematoxilina Gill Nº 3, o en solución verde claro, dentro de un vaso de Coplin de plástico.
9. Poner en el horno microondas a **800 vatios** durante **10 segundos**.
10. a. Si se utiliza hematoxilina Gill, aclarar con agua corriente del grifo durante **1–2 minutos**, y luego azular con concentrado de Scott sustituto del agua corriente a **temperatura ambiente**. Aclarar con agua corriente del grifo. Deshidratar, aclarar y montar.
    b. Si se utiliza solución verde claro, aclarar con agua desionizada y deshidratar rápidamente, aclarar y montar.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

Las sustancias PAS-positivas tiñen en rojo y el núcleo en azul. El portaobjetos de extracción de diastasa (α-amilasa) no tendrá ninguna tinción PAS visible de glicógeno, al compararlo con el portaobjetos de control positivo de glicógeno no digerido.

Si los resultados observados varían de los esperados, póngase en contacto con el Servicio Técnico de Sigma-Aldrich.

REFERENCIAS

1. Hotchkiss RD: A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparations. Arch Biochem 16:131, 1948
2. Sheehan DC, Hrapchak BB: Theory and Practice Histotechnology, 2nd ed. CV Mosby, St. Louis, (MO), pp 52, 164–167, 1980
3. Culling CFA, Allison RT, Barr WT: Cellular Pathology Technique, 4th ed. Butterworths, pp 216–220, 1985
4. Davey FR, Nelson DA: Periodic Acid Schiff (PAS) Stain. IN Hematology, 2nd ed. WJ Williams, E Buetler, AJ Erslev, RW Rundles, McGraw-Hill, New York, pp 1630–1632, 1977
5. Thompson SW: Selected Histochemical and Histopathological Methods, CC Thomas, Springfield, (IL), pp 520–539, 1966
6. Leong AS-Y, Milios J: Rapid immunoperoxidase staining of lymphocyte antigens using microwave irradiation. J Pathol 148:183, 1986
7. Brinn NT: Rapid metallic histologic staining using the microwave oven. J Histotechnol 6:125, 1983
8. Valle S: Special stains in the microwave oven. J. Histotechnol 9:237, 1986

Procedimiento número 395
Revisión anterior: 2003-09
Revisión: 2011-03



AR-MED Ltd., Runnymede Malthouse
Egham TW20 9BD Reino Unido

SIGMA-ALDRICH, INC.
3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 EE.UU. +1 314 771 5765
Servicio Técnico: a cobro revertido al +1 314 771 3122
o por correo electrónico a clintech@sial.com
Para pedidos: a cobro revertido al +1 314 771 5750
www.sigma-aldrich.com

SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH
P.O. 1120, 89552 Steinheim, Alemania 49-7329-970